Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research paper
Vol. 15, No. 2, Summer 2023, p. 285-297

Investigation of the Inhibitory Effects of CLF36 Peptide Derived from Camel Lactoferrin on NF-κB Signaling Pathway in Molecular Docking Simulation (*In silico*)

Hojjat Allah Yami[1], Mojtaba Tahmoorespur[2]*, Mohammad Hadi Sekhavati[3], Ali Javadmanesh[4]

Received: 08-09-2022
Revised: 14-01-2023
Accepted: 05-02-2023
Available Online: 05-02-2023

How to cite this article:
Yami, H., Tahmoorespur, M., Sekhavati, M.H., Javadmanesh, A. (2023). Investigation of the inhibitory effects of CLF36 peptide derived from camel lactoferrin on NF-κB signaling pathway in Molecular Docking Simulation (*In silico*). *Iranian Journal of Animal Science Research*, *15*(2), 285-297.
DOI: 10.22067/ijasr.2023.78545.1100

Introduction: Lactoferrin is secreted in the apo-form from epithelial cells in most exocrine fluids, such as saliva, bile, pancreatic and gastric fluids, tears and, particularly, in milk. Lactoferrin is the most dominant protein in milk after casein. This protein plays a crucial role in many biological processes including the regulation of iron metabolism, induction and modulation of the immune system, the primary defense against microorganisms, inhibiting lipid peroxidation and presenting antimicrobial activity against various pathogens such as parasites, fungi, bacteria, and viruses. The major antimicrobial effect of lactoferrin is related to its N-terminal tail where different peptides for instance lactoferricin and lactoferrampin which are important for their antimicrobial abilities are present. cLF chimera (CLF36 peptide) was derived from camel lactoferrin (cLF) consisting of 42 amino acids and has primary sequence of DLIWKLLVKAQEKFGRGKPSKRVKKMRRQWQACKSSHHHHHH. In addition, the results of previous study showed that cLFchimera had anti-inflammatory and regulatory activity of the immune system. Nuclear factor kappa B (NF-kB) transcription factors regulate several important physiological processes, including inflammation and immune responses, cell growth, apoptosis, and the expression of certain viral genes. NF-kB dimers are located in the cytoplasm in an inactive form through association with any of several IkB inhibitor proteins. The phosphorylation and degradation of IkB have received great attention as key steps for the regulation of
Nuclear factor kappa B (NF-kB) complexes. Phosphorylation of the IkB by IKK signals it for ubiquitination at specific lysine residues. The aim of this study was to investigate the inhibitory effects of the recombinant camel Lactoferrampin-Lactoferricin on nuclear factor kappa B (NF-κB) pathway.

Materials and Methods: CLF36 peptide was prepared through a previous study in Biotechnology Laboratory of Animal Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (GenBank accession number: MH327768.1). Protein data for inhibitory combinations of the Nuclear factor kappa B (NF-kB) pathway was collected from the Protein Data Bank (PDB) And UniProt.Physico-chemical properties analysis (atomic state, isoelectric point, half-life, hydrophobicity hydrophilicity , barometric and pH) was done using Expasy Prot Param online server. The inhibitory effects of this peptide was assessed by Molecular Docking Simulation (In silico). the simulation of the interaction (Docking) of CLF36 peptide with Nuclear factor kappa B (NF-kB) signaling pathway in upstream, pro-

1- Ph. D student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
2- Professor, Department ofAnimal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.
*Corresponding Author's Email: Tahmoores@um.ac.ir

inflammatory cytokines (e.g., TNF-α and IL-6) and in downstream, cytoplasmic IKKB and NF-κBp65 was done using ClusPro 2.0 software online.interaction diagram created by LigPlot+ showing the hydrogen bond network and the hydrophobic interactions of CLF36 peptid with the upstream and downstream Nuclear factor kappa B (NF-kB) pathways.

Results and Discussion: Bioinformatics analysis on The molecular interaction of this peptide with the active site of NF-κB proteins suggested that in may have role of the modulators and Anti-Inflammatory of immune processes by inhibitory effect on the TNF-α and IL-6 cytokines in upstream and IKK-β and NF-κB-p65 in downstream of the NF-κB signaling pathway. This results are similar to the inhibitory effects of Infliximab, Camelid Fab , NEMO and GILZ on the Nuclear factor kappa B (NF-kB) signaling pathway. Infliximab (Remicade) is a chimeric mAband its use is not very well tolerated in the majority of patients, infliximab therapy leads to the production of antibodies to infliximab in a small subset of patients. the Camelid Fab antibody with the highest (femtomolar) potency, displays a very large surface of interaction with IL-6. the regulatory role of NEMO in the IKK complex, since a number of genetic and biochemical studies clearly demonstrate that proinflammatory IKK activation is absolutely dependent upon the presence of functional NEMO. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) is a glucocorticoid responsive protein that links the nuclear factor-kappa B (NFκB) and the glucocorticoid signaling pathways. Functional and binding studies suggest that the proline-rich region at the carboxy terminus of Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) binds the p65 subunit of Nuclear factor kappa B (NF-kB) and suppresses the immunoinflammatory response.

Conclusion: The results of the interaction (Docking) of CLF36 peptide with Nuclear factor kappa B (NF-kB) signaling pathway indicates that, in upstream, will be inhibitory effect of CLF36 peptide in active site of pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF-α and IL-6) and in downstream, cFL36 peptide will bind to protein receptors of cytoplasmic IKKB and NF-κB p65. Therefore, these findings may provide a theoretical basis for therapeutic mechanisms of CLF36 peptide.

Keywords: Pro-inflammatory Cytokines, Nuclear Factor Kappa B Pathway, Molecular Docking Simulation

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران

Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۱۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲، ص. ۲۹۷-۲۸۵

بررسی اثر مهاری پپتید CLF36 مشتق شده از لاکتوفرین شتری بر مسیر پیام‌رسان NF-κB در محیط شبیه‌سازی شده مولکولی (*In silico*)

حجت‌الله یامی[۱]، مجتبی طهمورث‌پور[۲*]، محمد جواد سخاوتی[۳]، علی جواد منش[٤]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۶

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثرات مهاری لاکتوفرامپین- لاکتوفریسین شتری نوترکیب بر مسیر فاکتور هسته‌ای کاپا B (NF-κB) بود. این پپتید (CLF36) که با مطالعه قبلی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد (شماره دسترسی بانک ژن: MH327768.1) تهیه شده است. اثرات بازدارندگی این پپتید با شبیه‌سازی داکینگ مولکولی (*In silico*) ارزیابی شد. داده‌های پروتئین برای مسیر پیام رسان NF-κB از بانک داده‌های پروتئین (PDB) و UniProt جمع‌آوری شد. سپس، شبیه‌سازی برهم‌کنش (داکینگ) پپتید CLF36 با مسیر پیام‌رسان NF-κB در بالادست، سایتوکین‌های پیش‌التهابی (مانند TNF-α و IL-6) و در پایین‌دست، IKK-β و NF-κB-p65 سیتوپلاسمی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین ClusPro 2.0 انجام شد. تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی بر اساس برهم‌کنش‌های مولکولی این پپتید با جایگاه فعال پروتئین‌های مسیر NF-κB نشان داد که ممکن است نقش تعدیل‌کنندگی و ضدالتهابی در فرآیندهای ایمنی را با اثر مهاری بر روی سایتوکین‌های TNF-α و IL-6 در بالادست و IKK-β و NF-κB-p65 در پایین دست مسیر پیام‌رسان NF-κB داشته باشد. این نتایج مشابه با اثرات مهاری Infliximab، Camelid Fab، NEMO و GILZ بر روی مسیر پیام‌رسان NF-κB است. علاوه‌براین، این یافته‌ها ممکن است یک مبنای نظری برای مکانیسم‌های درمانی پپتید CLF36 فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: سایتوکین‌های پیش‌التهابی، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، مسیر فاکتور هسته‌ای کاپا B

مقدمه

لاکتوفرین (Lf) یک گلیکوپروتئین ۸۰ کیلو دالتونی متصل به آهن است که در سیستم ایمنی ذاتی نقش مهمی ایفا می‌کند و به‌عنوان یک مولکول مهم دفاعی میزبان در نظر گرفته می‌شود که دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای فیزیولوژیکی مانند ضد ویروسی (Berlutti *et al*., 2011)، آنتی‌باکتریائی (Embleton *et al*., 2013)، ضد قارچ، ضد انگلی (Leboffe *et al*., 2009)، تنظیم سیستم ایمنی‌بدن و فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Kanwar *et al*., 2015). پپتید لاکتوفرین کایمر[۵](CLF31)، اولین بار از طریق اتصال دو پپتید لاکتوفرامپین و لاکتوفریسین گاوی با اسیدآمینه لایزین به یکدیگر تو سط بول سچر و همکاران در سال ۲۰۰۹ به صورت تجاری

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی،دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: Tahmoores@um.ac.ir)

DOI: 10.22067/ijasr.2023.78545.1100

5- Chimera

تولید گردید (Bolscher *et al*., 2009). همچنین در سال ۲۰۱۲ تانگ و همکاران از طریق بیان در مخمر (*Pichia pastori*) موفق به تولید پروتئین نوترکیب لاکتوفرامپین- لاکتوفریسین گاوی شدند (Tang *et al*., 2012). در سال ۲۰۱۸، پپتید لاکتوفرین کایمر۳۶ (CLF36)که یک پپتید مشتق شده از لاکتوفرین شیر شتر می‌باشد (شماره دسترسی بانک ژن: MH327768.1)، در تحقیقی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت نوترکیب تولید شده است. تحقیق برروی این پپتید نشان می‌دهد که پپتید CLF36 از طریق تنظیم مسیر پیام‌رسان NF-κB سبب تنظیم و تعدیل فعالیت پاسخ ایمنی در زمان بروز التهاب و بیماری‌های خود التهابی می‌شود (Daneshmand *et al*., 2019; Daneshmand *et al*., 2020).

از این رو، یکی از مهم‌ترین مسیرهای تنظیمی پاسخ ایمنی در بدن، مسیر پیام‌رسان فاکتور هسته‌ای کاپا B[1] (NF-κB) می‌باشد که شامل مجموعه‌ای از فاکتورهای رونویسی دایمریک و تنظیم‌کننده اصلی پاسخ ایمنی و التهابی، چسبندگی سلولی، تمایز، تکثیر و آپوپتوز است و نکته مهمی که در طول این فرآیندها وجود دارد، این است که در صورت ادامه‌دار بودن فرآیند پاسخ ایمنی، یکسری از بیماری‌ها که در اصطلاح به آن‌ها بیماری‌های خودالتهابی گفته می شود، ایجاد می شوند (Dinarello, 2007). فاکتور رونویسی κB یک پروتئین هترودایمر است که به‌واسطه پروتئین مهارکننده κB و تشکیل کمپلکس IκBα-RHRP65 (PDB:1NFI) به‌صورت غیر فعال در سیتوپلا سم قرار دارد. در زمان بروز آسیب یا پاسخ به سیگنال‌های پاتوژنیک این مسیر فعال شده و در نهایت، سبب القاء بیان ژن‌های هدف در تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی (TNF, IL1, IL6, IL8) می‌شود (Hayden *et al*., 2006). از این رو، یکی از استراتژی‌های مهم درمانی جهت مقابله با بیماری‌های خود التهابی و تعدیل سیستم ایمنی، مهار مسیر بالادستی (خارج سلولی) و پایین دستی (آبشار مولکولی) و ممانعت اتصال پروتئین فعال شده NF-κB در هسته سلول به پروموتورهای ژن‌های هدف می‌باشد (Chen *et al*., 2000). تاکنون مطالعات متعددی در زمینه مهار مسیر فعالیت فاکتور رونویسی NF-κB صورت گرفته است که دلالت بر اهمیت مهار این کمپلکس پروتئینی دارد. تاکنون بیش از ۷۵۰ مهارکننده مسیر NF- κ B شناسایی شده‌اند. که انواع مختلف مولکول‌های طبیعی و سنتزی، اعم از آنتی‌اکسیدان‌ها، پپتیدها، پلی پپتیدهای مهندسی شده و پروتئین‌های ویروسی و میکروبی را شامل می‌شوند. چندین داروی ضد التهابی غیراستروئیدی (NSAID) از جمله آسپرین، ایبوپروفن، سولینداک و ایندومتاسین نیز می‌توانند مانع فعالیت NF- κ B در رده‌های سلولی شوند (Kopp and Ghosh, 1994). دانشمند و همکاران، در تحقیق اثرات پپتید نوترکیب CLF36 شتری را بر شاخص‌های مختلف تولید و سلامت در مرغان گو شتی تحت چالش بیماری التهاب روده (*Necrotic enteritis*) بررسی کردند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که استفاده از پپتید CLF36 از طریق تنظیم بیان ژن های تولیدکننده سایتوکاین های پیش التهابی، پروتئین MUC2 و پروتئینی‌های اتصالی به هم فشرده لایه اپیتلیال روده سبب کاهش ضایعات روده و مرگ میر در پرندگان، بهبود ویژگی‌های رشد، بهبود خصوصیات مورفولوژی روده (طول و عرض پرزهای روده)، ایجاد تعادل جمعیت میکروبی در روده شود (Daneshmand *et al*., 2020). نعمتی و همکاران، در پژوهشی روی سلول‌های ماکروفاژ موشی RAW264.7 نشان دادند که لاکتوفرین سبب مهار بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF-α و IL-6 شده و در نهایت، از طریق مهار بیان پروتئین p65 باعث مهار مسیر پیام‌رسان فاکتور هسته‌ای κB شده است (Nemati *et al*., 2021). سانگ و همکاران، در پژوهشی به بررسی اثرات تعدیلی سیستم ایمنی پپتید لاکتوفریسین- لاکتوفرامپین کایمر گاوی (LFCA) در موش های مبتلا به بیماری کولیت حاد پرداختند که نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پپتید آنتی باکتریال LFCA از طریق مهار مسیر پیام‌رسان NF-κBمی‌تواند مانع تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی شده و سبب بهبود فعالیت سد اپیتلیال روده (کاهش نفوذپذیری) و حفظ تعادل باکتریایی روده می شود (Song *et al*., 2019). دانشمند و همکاران، در پژوهشی به بررسی اثرات پپتید نوترکیب CLF36 شتری بر سلول های ایمنی (سایتو کاین های اینترلوکین ۲و ۶) و بیان پروتئین‌های اتصالی به هم فشرده لایه اپیتلیال روده (mucin2، Claudin-1 و Occludin) در مرغان گوشتی تحت چالش با باکتری *E.coli* پرداختند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پپتید CLF36 از طریق کاهش سطح بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی سبب تعدیل و تنظیم پاسخ ایمنی و التهابی در پرندگان شده و از ایجاد بیماری‌های التهابی روده نظیر کولون و کولیت جلوگیری می‌شود (Daneshmand *et al*., 2019).

لذا هدف از این پژوهش، مطالعه اثر دقیق پپتید CLF36 مشتق شده از پروتئین لاکتوفرین شتری بر مسیرهای مهاری بالا دستی و پایین دستی پیام‌رسان NF-κB در سطح مولکولی با استفاده از روش‌های مبتنی بر بیولوژی ساختاری و بررسی برهم‌کنش‌های آن با ماکرومولکول‌های خارج و داخل سلولی و در نهایت، به مقایسه عملکرد این پپتید با سایر ترکیبات پروتئینی و دارویی در مهار مسیر NF-κB می‌باشد.

1- Nuclear factor kappa B pathway

مواد و روش‌ها

اولین قدم برای ورود به مطالعات بیوانفورماتیکی، جمع‌آوری داده‌های پروتئینی می‌باشد که اطلاعات مربوط به توالی رسپتورهای سطح غشا، جایگاه‌های فعال سایر ماکرومولکول‌ها بوده و از پایگاه Uniprot (https://www.uniprot.org) و ساختار سه‌بعدی این پروتئین‌ها نیز از پایگاه PDB (http://www.rcsb.org/pdb/home.do) جمع‌آوری گردید. برای بررسی ساختار پروتئین‌ها و آنالیز خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن‌ها شامل نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، نیمه عمر، تعداد دنباله‌های منفی و مثبت، شاخص آلیفاتیک، شاخص بی ثباتی و مقدار هیدروفوبیسیتی[1] از سرور Expasy Prot Param (https://web.expasy.org/protparam) بهره گرفته شد. همچنین، با کمک سرورهای مختص مدل‌سازی نظیر سرور آنلاین I-Tasser (https://zhanggroup.org/I-TASSER) و Swiss model (https://swissmodel.expasy.org/interactive)، ساختار فضایی و سه‌بعدی سایر پروتئین‌ها رسم شد و بهترین مدل‌ها بر مبنای امتیازدهی نرم‌افزار انتخاب گردید. جهت اطمینان حاصل کردن از صحت مدل‌های پیش‌بینی شده، از سرور RAMPAGE (https://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php) برای بررسی نمودار راماچاندران و از سرور SAVES v6.0 (https://saves.mbi.ucla.edu) به‌منظور بررسی سایر پارامترهای دخیل در ساختار پروتئین استفاده شد. علاوه‌براین، جهت مدل‌سازی پپتید cLF36 از سرور آنلاین PEP-FOLD3.5 (https://mobyle.rpbs.univ-paris-diderot.fr/cgi-bin/portal.py#forms::PEP-FOLD3) استفاده شد و ساختار پپتید در شرایط دینامیک مولکولی[2] (MD) با استفاده از نرم‌افزار GROMACS 5.0.1 برای ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی گردید و در نهایت، کیفیت آن از طریق نرم‌افزار PROCHECK (http://servicesn.mbi.ucla. edu/PROCH ECK/) مورد ارزیابی قرار گرفت.

جهت بررسی برهم‌کنش‌های مولکولی پپتید CLF36 با ماکرومولکول‌های خارج و داخل سلولی با استفاده از روش داکینگ مولکولی مشخص گردید. به‌منظور انجام داکینگ مولکولی نوع و اندازه این برهم‌کنش‌ها از سرور Cluspro 2.0 (https://cluspro.bu.edu/login.php) و نرم‌افزارهای HADDOCK و Auto Dock بهره گرفته شد. در نهایت، جهت بررسی نتایج حاصل از برهم‌کنش‌های مولکولی پپتید CLF36 با گیرنده‌های مختلف پروتئینی به بررسی و مقایسه برهم‌کنش پپتید مورد نظر با سایر ترکیبات مهاری مسیر پیام‌رسان NF-κB با کمک نرم‌افزار LigPlot+ v.2.2 و نمایش آن از طریق نرم‌افزار PyMOL2.5.2 پرداخته شد.

نتایج و بحث

توالی رسپتورهای TNFRI، IL6Rα در سطح غشا از پایگاه Uniprot استخراج گردید. ساختار سه‌بعدی TNFα، IL6، IKKβ، IkBα و NF-κB (RHR P65) از بانک اطلاعات پروتئین (RCSB) جمع‌آوری شد. همچنین اطلاعات مربوط به ترکیبات مهاریFab، Infliximab، Camelid Fab، NEMO و GILZ نیز از پایگاه PDB به‌دست آمد که نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

ترکیبات پروتئینی مسیر بالادستی و پایین دستیNF-κB و همچنین ساختارهای سه‌بعدی گردآوری شده به همراه توالی اسیدآمینه ای آن‌ها در در جدول ۲ نشان داده شده است.

با استفاده از سرور آنلاین PEP-FOLD3.5 مدل‌سازی پپتید CLF36 انجام شد و شبیه‌سازی ساختار پیش‌بینی شده در شرایط دینامیک مولکولی[3] (MD) با استفاده از نرم‌افزار GROMACS 5.0.1 برای ۱۰ نانوثانیه صورت گرفت. همچنین ساختار فضایی و سه‌بعدی ترکیبات مهاری مسیر NF-κB نیز با استفاده از سرور آنلاین I-Tasser و Swiss model پیش‌بینی شد و جهت اطمینان حاصل کردن از صحت مدل‌های پیش‌بینی شده، از سرور RAMPAGE برای بررسی نمودار راماچاندران و از سرورSAVES v6.0 به‌منظور بررسی سایر پارامترهای دخیل در ساختار پروتئین استفاده شد. نتایج ساختارهای پیش‌بینی شده و توالی آن‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

جهت بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی پپتید CLF36 و مقایسه آن با سایر ترکیبات مهاری مسیر پیام‌رسان NF-κB به آنالیز وضعیت اتمی، نقطه ایزوالکتریک، نیمه عمر و همچنین بارالکتریکی و PH اسید آمینه‌های ترکیبات مهاری مسیر پیام‌رسان NF-κB پرداخته شد که نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است.

براساس نتایج حاصل از مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی پپتید CLF36 با ترکیبات مهاری مسیر NF-κB می‌توان گفت پپتید مورد نظر از لحاظ اندازه تفاوت قابل توجهی با آنتی‌بادی‌های Infliximab و Camelid Fab دارد. زیرا این پپتید با هدف افزایش قدرت اتصال به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی و مثبت، از دو دومین با ساختار مارپیچ آلفا که با اسید آمینه لیزین از هم تفکیک شده‌اند، طراحی شده است. همچنین وجود اسیدآمینه تریپتوفان در ساختار این پپتید با افزایش فعالیت آنتی باکتریال شده است. برهم‌کنش اسیدهای آمینه آبگریز و قلیایی، به‌ویژه تریپتوفان و آرژنین با هسته داخلی غشاء مهم‌ترین نقش را در فعالیت ضد میکروبی این پپتید دارند (Tanhaeian *et al*., 2018).

1- GRAVY
2- Molecular dynamics
3- Molecular dynamics

نقطه ایزوالکتریک پپتید CLF36 تفاوت زیادی نسبت به سایر ترکیبات مهاری مسیر پیام‌رسان دارد که علت آن وجود اسید آمینه‌های بازی آرژنین و لیزین در این پپتید می‌باشد که بالا بودن نقطه ایزوالکتریک باعث می‌شود تا در محیط‌های بازی، این پپتید دارای فعالیت بالائی داشته باشد. از طرف دیگر، نیمه عمر پپتید CLF36 با آنتی‌بادی Infliximab برابر می‌باشد، امّا ترکیبات مهاری NEMO و GILZ که از ترکیبات طبیعی مهارکننده مسیر پیام‌رسان NF-κB در حالت ثبات سلول و در شرایط غیرالتهابی هستند از طول عمر بسیار بالاتری نسبت به ترکیبات مهندسی و طراحی شده برخوردار هستند. زیرا در ترکیبات مهاری مهندسی شده، کوتاه بودن نیمه عمر باعث افزایش نفوذپذیری ترکیبات مهاری در بافت‌ها می‌شود، امّا در برخی از درمان‌های بالینی که نیاز به گردش آنتی‌بادی در دوره‌های طولانی‌مدت دارند، مشکل ایجاد می‌کند (Boswell *et al*., 2010).

همچنین شاخص‌های ناپایداری و آلیفاتیک پپتید CLF36 با سایر ترکیبات مهاری و به‌خصوص آنتی بادی های Infliximab و Camelid Fab در دامنه نزدیک به هم قرار دارند. از این رو نشان می‌دهد که پپتید CLF36 می‌تواند به‌عنوان یک ترکیب مهاری مسیر از پایداری بالائی برخوردار باشد، زیرا آنتی‌بادی‌های منوکلونال در برابر دناتوره‌کننده‌های شیمیایی و آنزیم‌های پروتئاز مقاوم هستند و در pH شدید پایداری بالایی دارند (Kraus *et al*., 2019).

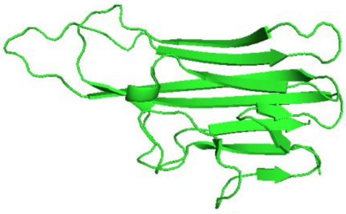
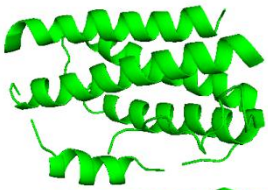
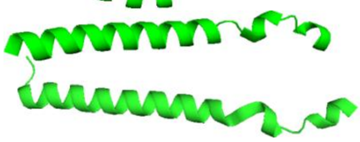
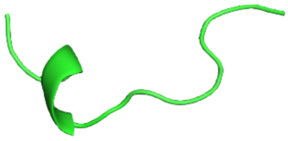
جدول ۱- مکانیسم‌های مهاری بالادستی و پایین دستی مسیر NF-κB

Table 1- Inhibitory mechanisms of Upstream and downstream of the NF-κB pathway

برهم‌کنش پروتئینی **Protein interaction**	مهارکننده **Inhibitory**	مکانیسم مهاری مسیر NF-κB **Inhibitory mechanisms of the NF-KB pathway**	منابع **References**
		مسیر بالا دستی **Upstream pathway**	
TNFRI- TNFα (PDB: 1EXT)	Fab Infliximab (PDB: 4G3Y)	مهار جایگاه اتصال رسپتور TNFα با TNFRI از طریق برهم‌کنش آرژنین ۵۲ و ۱۰۰، تیروزین ۱۰۲ و ۱۰۳ زنجیره جانبی سنگین Infliximab به‌ترتیب با آسپارتات ۱۴۰، گلوتامات ۱۰۷، ترئونین۱۰۵ و آلانین ۱۰۹ سایتوکاین TNFα و سپس اتصال واندروالسی گلوتامات ۵۳ و تریپتوفان ۹۴ زنجیره سبک Infliximab با هیستیدین ۵۳ و آسپارژین ۱۳۷ TNFα Inhibition of the binding site of TNFα receptor with TNFRI through the interaction of Arg 52 and 100, Tyr 102 and 103 of the heavy side chain of Infliximab with Asp 140, Glu 107, Thr 105 and Ala 109 respectively, of TNFα cytokine and then Van der Waals binding of Glu 53 and Try 94 of Infliximab light chain with His 53 and Asn 137	Liang *et al*., 2013
IL6—IL6R (PDB: 1P9M)	Camelid Fab (PDB: 4ZS7)	مهار جایگاه اتصال رسپتور IL6 با IL6R از طریق برهم‌کنش ترئونین ۵۹، آسپارتات ۵۸، تیروزین ۶۰ آسپارتات ۵۴، ۵۶، ۱۰۲، تیروزین ۳۳ و آرژنین ۳۲ زنجیره جانبی سنگین Camelid به‌ترتیب با آرژنین ۱۶۸، گلوتامات ۱۷۲، هیستیدین ۱۶۴، لیزین ۱۷۱، آرژنین۴۰، سرین ۳۷، آرژنین ۳۰ و آسپارتات ۳۴ سایتوکاین IL6 و سپس اتصال آسپارژین ۲۶ زنجیره سبک Camelid با سرین ۷۶ سایتوکاین IL6 Inhibition of IL6 receptor binding site with IL6R through interaction of Thr 59, Asp 58, Tyr 60, Asp 54, 56, 102, Tyr 33 and Arg 32 heavy side chain of Camelid with Arg 168, Glu 172, His 164, Lys 171, Arg 40, Ser 37, respectively., Arg 30 and Asp 34 of cytokine IL6 and then the connection of Asn 26 of Camelid light chain with Ser 76 of cytokine IL6	Blanchetot *et al*., 2016
		مسیر پایین دستی **Downstream pathway**	
IKKβ-IkBα (PDB: 3QA8)	NEMO (PDB: 3BRV)	مهار زنجیره A آنزیم مهارکننده کاپا B کیناز از طریق اتصال هیدروژنی NEMO با اسید آمینه‌های سرین ۷۳۳، فنیل آلانین ۷۳۴، گلوتامین ۷۳۰، گلوتامات ۷۲۰، سرین ۷۰۵ و آرژنین ۱۰۱ و همچنین مهار زنجیره B آنزیم با برهم‌کنش NEMO با اسید آمینه‌های گلوتامات ۷۱۱، گلوتامین ۷۳۲، گلوتامات ۷۲۹ و ترئونین ۷۲۶ Inhibition of the A chain of kappa B kinase inhibitory enzyme through hydrogen bonding of NEMO with amino acids Ser 733, Phe 734, Gln 730, Glu 720, Ser 705 and Arg 101, as well as inhibition of the B chain of the enzyme by NEMO interaction with amino acids Glu 711, Gln 732 , Glu 729 and Thr 726	Rushe *et al*., 2008
NLS P65-Importin α3 (PDB: 7LF4)	GILZ (PDB: 1DIP)	مهار انتقال پروتئین (P65) NFKB به درون هسته از طریق برهم‌کنش اسیدآمینه‌های پپتید GILZ با آرژنین ۲۹۴، لیزین ۲۹۳ و ترئونین ۳۰۰، لیزین ۲۹۵ و آرژنین ۲۹۶ از NLS P65 Inhibition of nuclear translocation of NFKB protein (P65) through the interaction of GILZ peptide amino acids with Arg 294, Lys 293 and Thr 300, Lys 295 and Arg 296 of NLS P65	Srinivasan *et al*., 2014

جدول ۲- ساختار سه‌بعدی ترکیبات مهاری مسیر NF-κB

Table 2- 3 D structure of inhibitory combinations of the NF-κB pathway

ترکیبات **Combinations**	ساختار سه‌بعدی **3 D structure**	توالی اسید آمینه **Amino acid sequence**
TNFα		VRSSSRTPSDKPVAHVVANPQAEGQLQWLNRRA NALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLIYSQVLFKGQ GCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQR ETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLEKGDRLSAEINR PDYLDFAESGQVYFGIIAL
IL6		PHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNM CESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFQSGFNEETC LVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMS TKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQA QNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM
IKKβ		AMAPAKKSEELVAEAHNLCTLLENAIQDTVREQD QSFTALDWSWLQTE
NLS p65		DRHRIEEKRKRTYETFKSIMKK

در نهایت، مدل‌سازی مولکولی اثرات مهاری پپتید CLF36 بر مسیر پیام‌رسان فاکتور هسته کاپا B و مقایسه آن با سایر ترکیبات مهاری (Infliximab، Camelid Fab، NEMO و GILZ) با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختص داکینگ پروتئین-پروتئین نظیر نرم‌افزار آنلاین ClusPro2.0 صورت گرفت. بر این اساس، میزان انرژی و موقعیت اتصال پپتید CLF36 و ترکیبات مهاری با سایتوکاین ها و گیرنده‌های مسیر پیام رسان NF-κB مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج براساس رابطه ۱ در جدول ۵ نشان داده شده است (Kozakov *et al*., 2013; Kozakov *et al*., 2017).

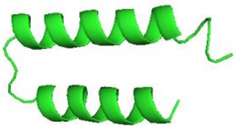
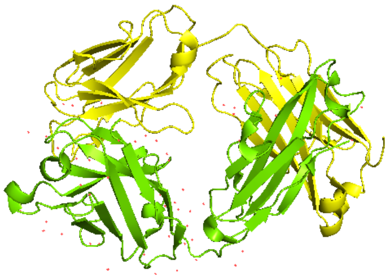
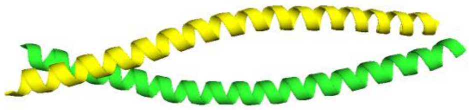
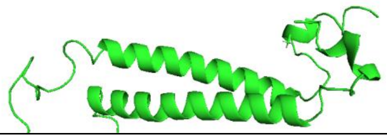
رابطه (۱) $E = 0.40E_{rep} \pm 0.40E_{att} + 600E_{elec} + 1.00E_{DARS}$

همچنین موقعیت اتصال پپتید CLF36 با سایتوکاین ها و گیرنده‌های پروتئینی مسیر بالادستی و پایین دستی NF-κB در شکل ۱ نشان داده شده است.

براساس نتایج حاصله می‌توان گفت که در مسیر بالادستی پیام‌رسان NF-κB، اتصال اسید آمینه‌های آرژنین ۲۸، هیستیدین ۴۰، سیستئین ۳۳، گلوتامین ۲۹، لیزین ۲۵، ۱۸، آرژنین ۲۲، لیزین ۲۱ از پپتید CLF36 به‌ترتیب با آسپارتات ۱۴۰، لیزین ۹۰، گلوتامات ۱۳۵، آسپارژین ۱۳۷، آرژنین ۱۳۸، ترئونین ۱۴۱، گلوتامین ۶۷، گلوتامین ۱۰۴، آلانین ۱۰۹ و گلوتامات ۱۰۷ سایتوکاین TNFα با انرژی اتصال -763.8 (kcal/mol) برقرار شده است. لذا، برا ساس نتایج تحقیقات لیانگ و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی اثرات مهاری داروی Infliximab در سایتوکاین TNFα مسیر پیام‌رسان κB، می‌توان گفت عملکرد پپتید CLF36 در مهار اسیدآمینه‌های آسپارتات ۱۴۰، گلو تا مات ۱۰۷، آلانین ۱۰۹مشابه به با زنجیره سنگین داروی Infliximab و مهار اسیدآمینه آسپارژین ۱۳۷همانند زنجیره سبک داروی Infliximab بوده است که ممکن است همانند این دارو سبب مهار جایگاه فعال اتصال سایتوکاین TNFα به گیرنده اختصاصی خود TNFRI شده و در نهایت، مسیر پیام رسان NF-κB را متوقف سازد (Liang *et al*., 2013). همچنین نتایج این پژوهش با یافته‌های هو و همکاران در سال۲۰۱۳ در بررسی اثرات مهاری داروی Adalimumab Fab بر سایتوکاین پیش التهابی TNFα نیز هم‌خوانی دارد. براساس یافته‌ها، برهم‌کنش پپتید CLF36 با اسیدآمینه‌های لیزین ۹۰، گلوتامات ۱۳۵، آسپارژین ۱۳۷، آرژنین ۱۳۸، ترئونین ۱۴۱ و گلوتامین ۶۷ از سایتوکاین TNFα مشابه با داروی Adalimumab Fab می‌باشد (Hu *et al*., 2013). نتایج اثرات مهاری پپتید CLF36 با سایتوکاین TNFα در شکل ۲.A نشان داده شده است.

جدول ۳- ساختار سه‌بعدی ترکیبات مهاری مسیر NF-κB

Table 3- 3 D structure of inhibitory combinations of the NF-κB pathway

ترکیبات مهاری **Combinations**	**ساختار سه‌بعدی** **3 D structure**	**توالی اسید آمینه** **Amino acid sequence**
CLF36		DLIWKLLVKAQEKFGRGKPSKRVKK MRRQWQACKSSHHHHHH
Infliximab (Remicade)		DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASQFVGSSIHWYQQ RTNGSPRLLIKYASESMSGIPSRFSGSGSGTDFTLSINT VESEDIADYYCQQSHSWPFTFGSGTNLEVKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECEVKLEESGGG LVQPGGSMKLSCVASGFIFSNHWMNWVRQSPEKGLE WVAEIRSKSINSATHYAESVKGRFTISRDDSKSAVYL QMTDLRTEDTGVYYCSRNYYGSTYDYWGQGTTLTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
Camelid Fab (68F2)		QAVLTQPPLVSGTPGQTVTISCAGANNDIGTYAYVS WYQQLPGTAPKLLIYKVTTRASGIPSRFSGSKSGNTA SLTISGLQSEDEADYYCASYRNFNNAVFGRGTHLTVL GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAV TVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSL TPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSEVQL QESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSITTRYYAWSWIRQ PPGKGLEWMGVIDYDGDTYYSPSLKSRTSISWDTSK NQFSLQLSSVTPEDTAVYYCARDPDVVTGFHYDYWG QGTQVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
NEMO		MWEQGAPETLQRCLEENQELRDAIRQSNQILRERCEE LLHFQASQREEKEFLMCKFQEARKLVERLGLEKMWE QGAPETLQRCLEENQELRDAIRQSNQILRERCEELLHF QASQREEKEFLMCKFQEARKLVERLGLEK
GILZ		MDLVKNHLMYAVREEVEILKEQIRELVEKNSQLERE NTLLKTLASPEQLEKFQSRLSPEEPAPETP EAPEAPGGSAV

از طرف دیگر، در مسیر بالادستی NF-κB، برهم‌کنش اسید آمینه‌های آسپارتات ۱، هیستیدین ۴۱، ۴۰، ۳۷ و سرین ۳۶ از پپتید CLF36 به‌ترتیب با اسیدآمینه‌های آرژنین ۴۰ و ۱۶۸، لوسین ۱۶۵، هیستیدین ۱۶۴، آسپارژین ۴۸ و تریپتوفان ۱۵۷ سایتوکاین IL6 با انرژی اتصال (kcal/mol) -723.7 مشخص شده است. بنابراین، نتایج نشان می‌دهد که عملکرد پپتید cFL36 در مهار اسیدآمینه‌های آرژنین ۴۰، ۱۶۸ و همچنین هیستیدین ۱۶۴ مشابه با نتایج بلانچیتوت و همکاران ۲۰۱۶ در بررسی اثرات مهاری داروی Camelid Fab بر روی سایتوکاین IL6 بوده است (Blanchetot *et al*., 2016). لذا، می‌توان گفت که احتمالاً پپتید CLF36 در مهار مسیر پیام‌رسان NF-κB همانند زنجیره سنگین داروی Camelid Fab عمل کرده و در نهایت، سبب مهار جایگاه فعال اتصال سایتوکاین IL6 به گیرنده اختصای خود IL1RI خواهد شد. نتایج اثرات مهاری پپتید CLF36 با سایتوکاین IL6 در شکل ۲.B نشان داده شده است.

اما در مسیر پایین دست پیام‌رسان NF-κB، نتایج نشان می‌دهد که پپتید CLF36 با اتصال به جایگاه فعال آنزیم مهارکننده کاپا B کیناز (IKKβ) و برهم‌کنش اسید آمینه‌های آرژنین ۱۶ و ۲۸ از پپتید CLF36 با تریپتو فان۷۴۱، گلو تامین۷۳۰ و ۷۴۳ آنزیم IKKβ و در کنار آن برهم‌کنش هیستیدین ۳۹، سرین ۳۵، گلوتامین ۳۱ و لیزین ۳۴ پپتید CLF36 به‌ترتیب با گلوتامین ۷۳۰، آسپارتات ۷۲۵، گلوتامات

۷۲۹، گلو تامین ۷۳۲ و فنیل آلانین ۷۳۴ از آنزیم IKKβ با انرژی اتصال 1152.9- (kcal/mol) سبب مهار جایگاه فعال این آنزیم شده و نتایج حاصله با بررسی روشه و همکاران در ۲۰۰۸ بر روی اثرات مهاری NEMO در مهار جایگاه فعال آنزیم IKKβ مطابقت دارد. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که ترکیب مهاری NEMO در شرایط طبیعی در سلول‌های فاقد خا صیت التهابی به ا سید آمینه‌های سرین ۷۳۳، فنیل آلانین ۷۳۴، گلوتامین ۷۳۰، گلوتامات ۷۲۰، سرین ۷۰۵، گلوتامات ۷۱۱، گلوتامین ۷۳۲ و ۷۲۹ و ترئونین ۷۲۶ از جایگاه فعال آنزیم IKKβ متصل شده و سبب مهار مسیرNF-κB می‌شود (Rushe *et al*., 2008). لذا پپتید CLF36 در مهار اسید آمینه‌های فنیل آلانین ۷۳۴، گلوتامین ۷۳۰، ۷۳۲ و ۷۲۹ آنزیم IKKβ با ترکیب طبیعی مهار NEMO مشابهت دارد. بنابراین، می‌توان این گونه بیان کرد که احتمالاً پپتید مورد نظر با مهار جایگاه فعال آنزیم IKKβ، سبب ممانعت اتصال به پروتئین IkBα شده و آبشار مولکولی مسیر پایین دست پیام‌رسان NF-κB قطع خواهد شد. نتایج برهم‌کنش‌های این مسیر در شکل ۲.C نشان داده است.

جدول ٤- مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی پپتید CLF36 و سایر ترکیبات مهاری مسیر NF-κB

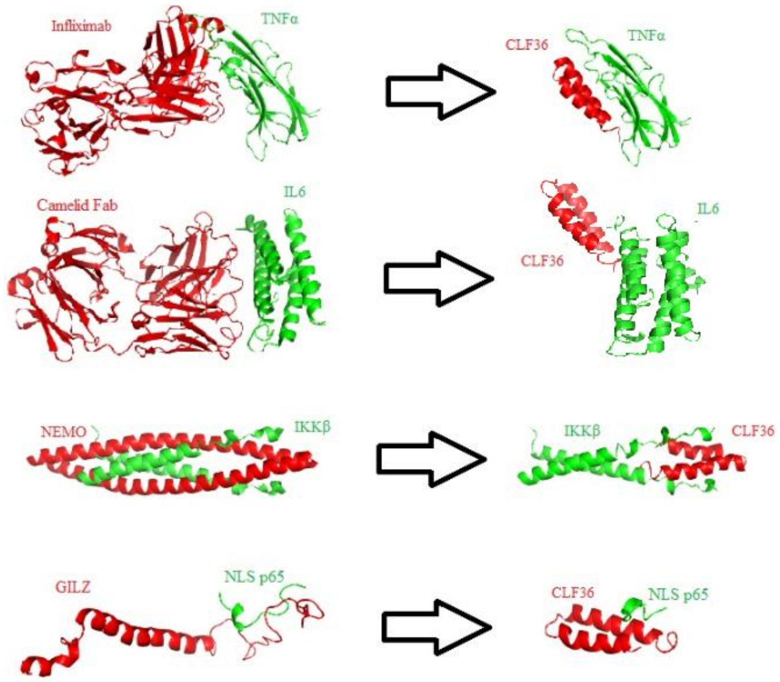
Table 4-Comparison of physicochemical properties of CLF36 peptide and other compounds inhibiting the NF-κB

آنالیز Analyze	CLF36	Infliximab	Camelid Fab	NEMO	GILZ
وزن مولکولی Weight molecular	5139.05	47752.13	46717.05	8520.70	8712.85
نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	11.17	7.17	7.64	5.21	4.65
نیمه عمر Half time (hours)	1.1	1.1	0.8	30	30
دنباله‌های منفی (Asp + Glu)	2	39	30	15	16
دنباله‌های مثبت (Arg + Lys)	12	39	31	12	9
شاخص نا پایداری Instability index	56.70	54.24	47.43	58.70	78.33
شاخص آلیفاتیک Index aliphatic	55.71	66.84	69.41	76.71	87.40
هیدروفوبیسیتی GRAVY	-1.367	-0.369	-0.282	-0.997	-0.717

جدول ۵– مقایسه انرژی اتصال برای برهم‌کنش پپتید CLF36 با جایگاه فعال مسیرهای بالادستی و پایین دستی NF-κB

Table 5- Comparison of binding energy for the interaction of CLF36 peptide with the active site of NF-κB pathway

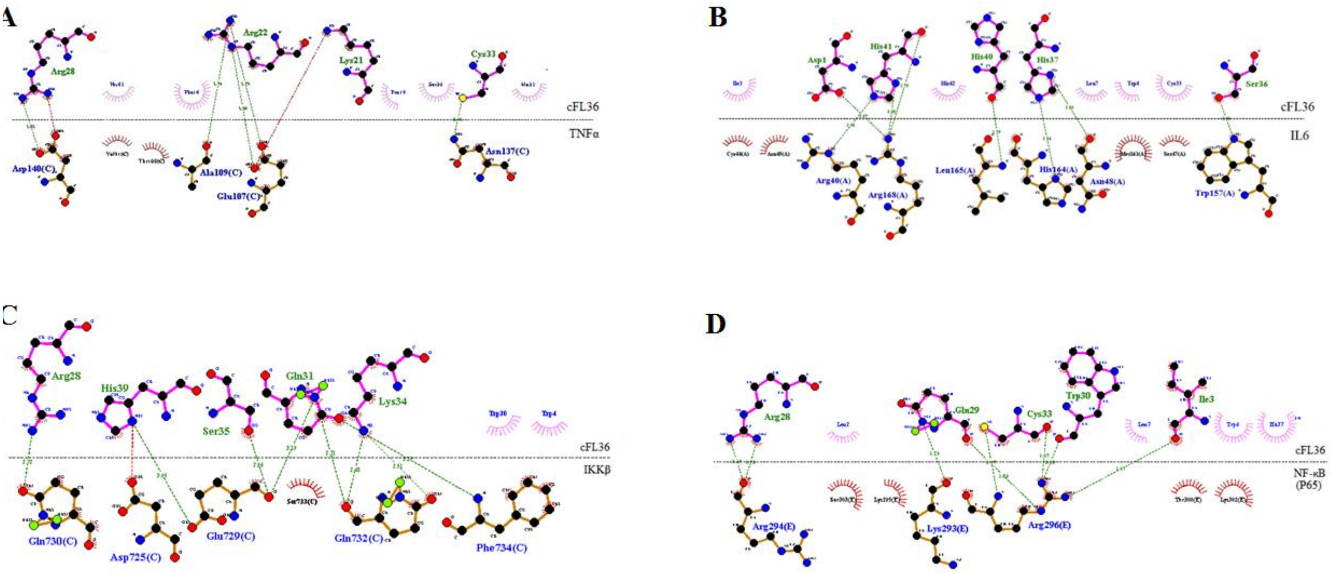
جایگاه فعال Active site	پپتید CLF36 CLF36 peptide انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول) -ΔG (kcal/mol)	
مسیر بالادستی Upstream pathway	مرکز Center	کمترین انرژی Lowest energy
TNFα	-736.3	-763.8
IL6	-642.8	-723.7
مسیر پایین دستی Downstream pathway		
IKKβ	-1129.3	-1152.9
NF-κB (P65)	-481.0	-534.5



شکل ۱- موقعیت اتصال پپتید CFL36 با گیرنده‌های پروتئینی مسیر NF-κB
Figure 1- CFL36 peptide binding position with protein receptors of the NF-κB pathway

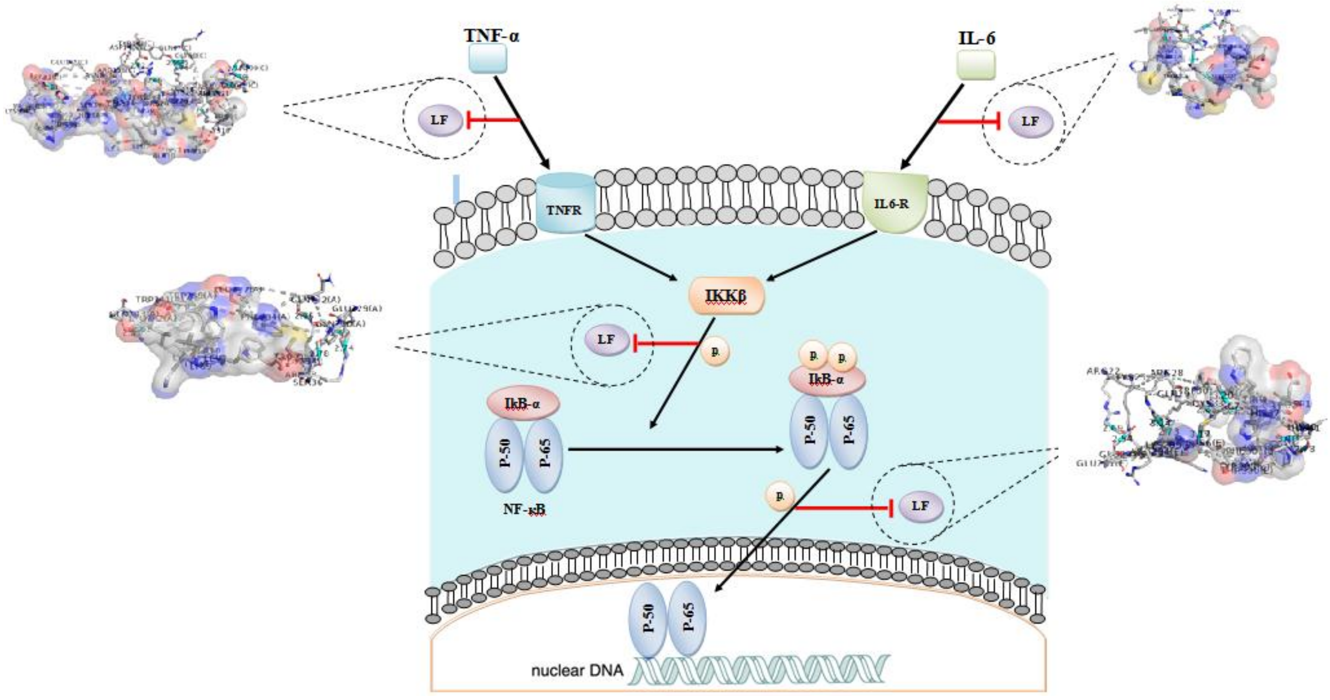
همچنین، نتایج نشـــان می‌دهد که پپتید CLF36 از طریق برهم‌کنش اسید آمینه‌های آرژنین ۲۸، گلوتامین ۲۹، سیستئین ۳۳ و تریپتوفان ۳۰، ایزولوســین ۳ به‌ترتیب با اســیدهای آمینه‌های آرژنین ۲۹۴، لیزین ۲۹۵ و ۲۹۳ از جایگاه NLS پروتئین NF-κB(P65) ، ممکن است سبب مهار اتصال پروتئین انتقال‌دهنده Importin α3 به این جایگاه فعال NLS شـــده و در نهایت، از انتقال پروتئین فعال NF-κB(P65) به داخل هســـته جلوگیری کند. زیرا براســاس نتایج فلوریو و همکاران در ســال ۲۰۲۲ که به بررســی برهم‌کنش‌های پروتئین Importin α3 با هترودایمر p50/p65 پرداخته‌اند، اســید آمینه‌های لیزین ۲۹۵، آرژنین ۲۹۶ و ۲۹۴ از اسیدآمینه‌های اصلی در برقراری ارتباط بین پروتئین NF-κB(P65) و Importin α3 معرفی شده‌اند (Florio *et al*., 2022)؛ که این امر می‌تواند اثرات مهاری بر عملکرد فاکتور نســخه‌برداری NF-κB در بیان ســایتوکاین‌های پیش التهابی درون هسته داشته باشد. همچنین نتایج ما در این پژوهش با بررســی‌های اســرینیواســان و همکاران در سـال ۲۰۱۴ بر روی اثرات مهاری پپتید GILZ بر NLS پروتئین NF-κB(P65) مطابقت دارد. نتایج آن‌ها نشـــان داد که پپتید GILZ از طریق برهم‌کنش با اســیدآمینه‌های آرژنین ۲۹۴، لیزین ۲۹۳، ترئونین ۳۰۰، لیزین ۲۹۵ و آرژنین ۲۹۶ از NLS پروتئین P65 ســبب ممانعت از اتصــال آن به پروتئین انتقال‌دهنده Importin α3 شـده و در نهایت، مانع انتقال آن به درون هســـته می‌شـــود (Srinivasan *et al*., 2014). نتایج برهم‌کنش‌های این مسیر در شکل ۲.D نشان داده است.

بنابراین، براســاس نتایج حاصــل از داکینگ پپتید CLF36 با پروتئین‌های مسـیر NF-κB در محیط شـبیه‌سـازی شـده مولکولی و مقایسه نتایج با اثرات مهاری سایر ترکیبات دارویی می‌توان گفت که پپتید CLF36 از طریق حفظ سـاختار خود با اتصـال پایدار به جایگاه فعال سایتوکاین‌های پیش التهابی TNF-α، IL-6 در مسیر بالادستی فاکتور هسته کاپا B سبب مهار اتصال این سایتوکاین‌ها با رسپتورهای سطح غشای سلول هدف شده و در نهایت، پیام‌رسانی مسیر NF-κB متوقف خواهد شد. همچنین در مسیر پایین دستی این پیام‌رسان نیز پپتید CLF36 از طریق مهار جایگاه فعال آنزیم IKKβ به توقف آبشار مولکولی داخل سلولی کمک خواهد کرد. در کنار آن پپتید CLF36 با مهار جایگاه اتصــال NLS فاکتور رونویســـی پروتئین NF-(P65)κB ســبب مهار انتقال آن به درون هســـته شـــده و در نهایت، عمل پروتئین P65 را به‌عنوان فاکتور رونویســـی در بیان ژن‌های مربوط به سایتوکاین‌های پیش التهابی (TNF-α و IL-6) مختل کرده و موجب مهار مسـیر پیام‌رسـان NF-κB در شـرایط بروز التهاب و بیماری‌های خود التهابی خواهد شد و می‌توان این پپتید را به‌عنوان یکی از ترکیبات مهاری این مسـیر پیام‌رسـان معرفی گردد. مسـیرهای مهاری پپتید و برهم‌کنش آن با ترکیبات پروتئینی مسیر بالادستی و پایین دستی در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۲- برهم‌کنش‌های مولکولی پپتید CFL36 با مسیرهای بالادستی و پایین دستی NF-κB

Figure 2- Molecular interactions of CFL36 peptide with upstream and downstream NF-κB pathways



شکل ۳- برهم‌کنش‌های مولکولی پپتید CFL36 با پروتئین‌های مسیر پیام‌رسان NF-κB

Figure 3- Molecular interactions of CFL36 peptide with the NF-κB proteins

نتیجه‌گیری کلی

پروتئین لاکتوفرین و پپتیدهای مشـــتق شـــده از آن به‌صـــورت طبیعی از مواد خوراکی به‌دست می‌آیند. بنابراین، دارای عوارض جانبی کمی می‌با شند، در نهایت می‌توانند کاندیدای منا سبی برای داروهای نســـل جدید به شـــمار آیند. تاکنون چندین مطالعه در زمینه اثرات پروتئین لاکتوفرین و پپتیدهای آن برروی سیستم ایمنی صورت گرفته و در چندین مطالعه اثرات پپتید نوترکیب CLF36 بر تعدیل سیســتم ایمنی پرندگان مورد تأیید قرار گرفته است. مهار مسیر پیام‌رسان NF-

κB به‌عنوان یکی از روش‌های تعدیل و تنظیم سیستم ایمنی محسوب می‌شود. براساس نتایج این پژوهش، می‌توان گفت در محیط شبیه سازی شده مولکولی، پپتید CLF36 مشتق شده از لاکتوفرین شتری اثرات مهاری مشابهی با سایر ترکیبات دارویی متداول در مهار مسیرهای بالادستی و پایین دستی پیام‌رسان NF-κB نظیر Infliximab، Camelid Fab، NEMO و GILZ دارد. امّا جهت حصول اطمینان از عملکرد پپتید CLF36 می‌بایست نتایج حاصله در شرایط آزمایشگاهی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

References

1. Berlutti, F., Pantanella, F., Natalizi, T., Frioni, A., Paesano, R., Polimeni, A., & Valenti, P. (2011). Antiviral properties of lactoferrin—a natural immunity molecule. *Molecules, 16*(8), 6992-7018. https://doi.org/10.3390/molecules16086992
2. Blanchetot, C., De Jonge, N., Desmyter, A., Ongenae, N., Hofman, E., Klarenbeek, A., Sadi, A., Hultberg, A., Kretz-Rommel, A., & Spinelli, S. (2016). Structural mimicry of receptor interaction by antagonistic interleukin-6 (IL-6) antibodies. *Journal of Biological Chemistry, 291*(26), 13846-13854. https://doi.org/10.1074/jbc.M115.695528
3. Bolscher, J. G., Adão, R., Nazmi, K., Van den Keybus, P. A., Van't Hof, W., Amerongen, A. V. N., Bastos, M., & Veerman, E. C. (2009). Bactericidal activity of LFchimera is stronger and less sensitive to ionic strength than its constituent lactoferricin and lactoferrampin peptides. *Biochimie, 91*(1), 123-132. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.05.019
4. Boswell, C. A., Tesar, D. B., Mukhyala, K., Theil, F. P., Fielder, P. J., & Khawli, L. A. (2010). Effects of charge on antibody tissue distribution and pharmacokinetics. *Bioconjugate Chemistry, 21(12)*, 2153-2163. https://doi.org/10.1021/bc100261d
5. Chen, Y. Q., Sengchanthalangsy, L. L., Hackett, A., & Ghosh, G. (2000). NF-κB p65 (RelA) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure, 8(4)*, 419-428. https://doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00123-4
6. Daneshmand, A., Kermanshahi, H., Sekhavati, M. H., Javadmanesh, A., & Ahmadian, M. (2019). Antimicrobial peptide, cLF36, affects performance and intestinal morphology, microflora, junctional proteins, and immune cells in broilers challenged with *E. coli*. *Scientific Reports, 9(1)*, 1-9. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50511-7
7. Daneshmand, A., Kermanshahi, H., Sekhavati, M. H., Javadmanesh, A., Ahmadian, M., Alizadeh, M., & Aldawoodi, A. (2020). Effects of cLFchimera peptide on intestinal morphology, integrity, microbiota, and immune cells in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. *Scientific Reports*, *10(1)*, 11-1. https://doi.org/10.1038/s41598-020-74754-x
8. Dinarello, C. A. (2007). Historical insights into cytokines. European Journal of Immunology. *European Journal of Immunology, 37(1)*, 34-45. https://doi.org/10.1002/eji.200737772
9. Embleton, N. D., Berrington, J. E., McGuire, W., Stewart, C. J., & Cummings, S. P. (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine, 18(3)*, 143-149. https://doi.org/10.1016/j.siny.2013.02.001
10. Florio, T. J., Lokareddy, R. K., Yeggoni, D. P., Sankhala, R. S., Ott, C. A., Gillilan, R. E., & Cingolani, G. (2022). Differential recognition of canonical NF-κB dimers by Importin α3. *Nature Communications, 13(1)*, 1-16. https://doi.org/10.1038/s41467-022-28846-z
11. Hayden, M., West, A., & Ghosh, S. (2006). NF-κB and the immune response. *Oncogene, 25(51)*, 6758-6780. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209943
12. Hu, S., Liang, S., Guo, H., Zhang, D., Li, H., Wang, X., Yang, W., Qian, W., Hou, S., & Wang, H. (2013). Comparison of the inhibition mechanisms of adalimumab and infliximab in treating tumor necrosis factor α-associated diseases from a molecular view. *Journal of Biological Chemistry, 288(38)*, 27059-27067. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.491530
13. Kanwar, J. R., Roy, K., Patel, Y., Zhou, S.F., Singh, M. R., Singh, D., Nasir, M., Sehgal, R., Sehgal, A., & Singh, R. S. (2015). Multifunctional iron bound lactoferrin and nanomedicinal approaches to enhance its bioactive functions. *Molecules, 20(6)*, 9703-9731. https://doi.org/10.3390/molecules20069703
14. Kopp, E., & Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF-κB by sodium salicylate and aspirin. *Science, 265(5174)*, 956-959. https://doi.org/10.1126/science.8052854
15. Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking?. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 81(12)*, 2166-2159. https://doi.org/10.1002/prot.24403
16. Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nature Protocols, 12(2)*, 255-278. https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169
17. Kraus, T., Winter, G., & Engert, J. (2019). Test models for the evaluation of immunogenicity of protein aggregates.

International Journal of Pharmaceutics, 559(1), 192-200. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.01.015
18. Leboffe, L., Giansanti, F., & Antonini, G. (2009). Antifungal and antiparasitic activities of lactoferrin. Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry .*Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents, 8(2)*, 114-127. https://doi.org/10.2174/187152109787846105
19. Liang, S., Dai, J., Hou, S., Su, L., Zhang, D., Guo, H., Hu, S., Wang, H., Rao, Z., & Guo, Y. (2013). Structural basis for treating tumor necrosis factor α (TNFα)-associated diseases with the therapeutic antibody infliximab. *Journal of Biological Chemistry*, *288(19)*, 13799-13807. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433961
20. Nemati, M., Akseh, S., Amiri, M., Nejabati, H. R., Jodati, A., Maroufi, N. F., Faridvand, Y., & Nouri, M. (2021). Lactoferrin suppresses LPS-induced expression of HMGB1, microRNA 155, 146, and TLR4/MyD88/NF-κB pathway in RAW264. 7 cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *43(2)*, 153-159. https://doi.org/10.1080/08923973.2021.1872616
21. Rushe, M., Silvian, L., Bixler, S., Chen, L. L., Cheung, A., Bowes, S., Cuervo, H., Berkowitz, S., Zheng, T., & Guckian, K. (2008). Structure of a NEMO/IKK-associating domain reveals architecture of the interaction site. *Structure, 16(5)*, 798-808. https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.012
22. Song, L., Xie, W., Liu, Z., Guo, D., Zhao, D., Qiao, X., Wang, L., Zhou, H., Cui, W., & Jiang, Y. (2019). Oral delivery of a Lactococcus lactis strain secreting bovine lactoferricin–lactoferrampin alleviates the development of acute colitis in mice. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103(15)*, 6169-6186. https://doi.org/10.1007/s00253-019-09898-6
23. Srinivasan, M., Blackburn, C., & Lahiri, D. K. (2014). Functional characterization of a competitive peptide antagonist of p65 in human macrophage-like cells suggests therapeutic potential for chronic inflammation. *Drug Design, Development and Therapy*, 8(1), 2409-2419. https://doi.org/10.2147/DDDT.S59722
24. Tang, X. S., Shao, H., Li, T. J., Tang, Z. R., Huang, R. L., Wang, S. P., Kong, X. F., Wu, X., & Yin, Y. L. (2012). Dietary supplementation with bovine lactoferrampin–lactoferricin produced by Pichia pastoris fed-batch fermentation affects intestinal microflora in weaned piglets. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *168(4)*, 887-898. https://doi.org/10.1007/s12010-012-9827-0
25. Tanhaeian, A., Ahmadi, F. S., Sekhavati, M. H., & Mamarabadi, M. (2018). Expression and purification of the main component contained in camel milk and its antimicrobial activities against bacterial plant pathogens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *10(4)*, 787-793. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9416-9